

**MENU****SEARCH****INDEX****DETAIL****JAPANESE**

1 / 1

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 2001-337089

(43)Date of publication of application : 07.12.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/53  
C12M 1/00  
C12N 15/09  
C12Q 1/68  
G01N 31/22  
G01N 33/566

(21)Application number : 2000-156870

(71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD

(22)Date of filing : 26.05.2000

(72)Inventor : IWAKI YOSHIHIDE  
TAKESHITA YUMIKO  
SHINOKI HIROSHI  
MAKINO YOSHIHIKO  
SESHIMOTO OSAMU

(54) DNA FRAGMENT FIXING METHOD, DETECTION METHOD OF DNA CHIP AND NUCLEIC ACID FRAGMENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method of fixing a single stranded DNA fragment on a substrate surface by conjugation it using a disulfonic compound and a detection method of a DNA chip and a nucleic acid fragment as a sample.

SOLUTION: In the method for fixing a single stranded DNA fragment having a reactive group on a substrate surface at a terminal part thereof, a double helical DNA fragment is bonded onto the substrate surface through a bond group: -R3R2C-R1HC-SO2-L-SO2-(CR1R2)n- or a bond group: -(R2R1C)n-SO2-L-SO2-(CR1R2)n-[wherein R1, R2 and R3 represent atom or group independent of each other selected from among a group comprising 1-6HC alkyl group and 6-20 Calyl group, n integer of 1-6 and L bivalent combination group].

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-337089

(P2001-337089A)

(43) 公開日 平成13年12月7日 (2001. 12. 7)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 4 2
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 31/22	1 2 1 P 4 B 0 6 3
G 0 1 N 31/22	1 2 1	33/566	
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-156870(P2000-156870)

(22) 出願日 平成12年5月26日 (2000. 5. 26)

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社  
神奈川県南足柄市中沼210番地

(72) 発明者 岩木 義英

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ  
イルム株式会社内

(72) 発明者 竹下 由美子

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ  
イルム株式会社内

(74) 代理人 100074675

弁理士 柳川 泰男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA断片の固定方法、DNAチップおよび核酸断片の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 基板表面に一本鎖のDNA断片をジスルホン化合物を用いて共有結合により固定する方法DNAチップ及び試料核酸断片の検出方法を提供すること。

【解決手段】 反応性基を有する一本鎖のDNA断片をその末端部にて基板表面に固定する方法であって、二本鎖のDNA断片を、結合基： $-R^3R^2C-R^1HC-SO_2-L-SO_2-CHR^1-CR^2R^3-$ 、結合基： $-R^3R^2C-R^1HC-SO_2-L-SO_2-(CR^1R^2)_n-$ 、又は結合基： $-(R^2R^1C)_n-SO_2-L-SO_2-(CR^1R^2)_n-$  [式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、及び炭素原子数が6乃至20のアリール基からなる群より選ばれる原子又は基を表し； $n$ は、1乃至6の整数を表し；そして、 $L$ は、二価の連結基を表す] を介して基板表面に結合させる方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 表面に反応性基が導入された基板の上に、一方の末端部に反応性基を有する一本鎖のDNA断片と反応性基を有しない一本鎖のDNA断片とからなる二本鎖のDNA断片を含む水性液を接触させることによって、基板表面の反応性基と該二本鎖のDNA断片の内の一方のDNA断片が有する反応性基とを反応させて共有結合を形成させることにより、該二本鎖のDNA断片を基板表面に固定する工程；(2) 該二本鎖のDNA断片から反応性基を有しない一本鎖のDNA断片を遊離させる工程；そして、(3) 遊離した一本鎖のDNA断片を除去する工程を含む、反応性基を有する一本鎖のDNA断片をその末端部にて基板表面に固定する方法であって、  
上記工程(1)において、該二本鎖のDNA断片を、結合基： $-R^3R^2C-R^1HC-SO_2-L-SO_2-CH(R^1-CR^2R^3)-$ 、結合基： $-R^3R^2C-R^1HC-SO_2-L-SO_2-(CR^1R^2)_n-$ 、あるいは結合基： $-(R^2R^1C)_n-SO_2-L-SO_2-(CR^1R^2)_n-$  [式中、 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、および炭素原子数が6乃至20のアリール基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表し； $n$ は、1乃至6の整数を表し；そして、 $L$ は、二価の連結基を表す]を介して基板表面に結合させることを特徴とする固定方法。

【請求項2】 一方の末端部に反応性基を有する一本鎖のDNA断片および反応性基を有しない一本鎖のDNA断片として、共に、塩基数が50乃至100000の範囲にあるものを用いることを特徴とする請求項1に記載の固定方法。

【請求項3】 一本鎖のDNA断片が有する反応性基が、アミノ基であることを特徴とする請求項1に記載の固定方法。

【請求項4】 請求項1乃至3の内の何れかの項に記載の固定方法によって作製されたDNAチップ。

【請求項5】 請求項4に記載のDNAチップの表面に、蛍光物質で標識した核酸断片を含む水性液を付与し、DNAチップ上のDNA断片と蛍光物質で標識した試料核酸断片とのハイブリッドを形成させ、そして、蛍光物質から発生する蛍光を検出することを特徴とする、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する試料核酸断片を検出する方法。

【請求項6】 請求項4に記載のDNAチップの表面に、蛍光発生基を有するインターカレータと試料核酸断片とを含む水性液を付与し、DNAチップ上のDNA断片と試料核酸断片とのハイブリッドを形成させ、そして、該ハイブリッド構造内に取り込まれたインターカレータの蛍光発生基から発生する蛍光を検出することを特徴とする、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する試料核酸断片の検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子の発現、変異、多型等の同時解析に非常に有用である、DNA断片が共有結合によって基板表面に固定されたDNAチップの製造方法、およびDNAチップに関する。本発明は、また、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する試料核酸断片の検出方法にも関する。

## 【0002】

【従来の技術】多彩な生物の全遺伝子機能を効率的に解析するための技術開発が進んでおり、その解析手段として、DNAチップが利用されている。DNAチップは通常、スライドガラス等の固相担体に多数のDNA断片を整列固定させたマイクロアレイの形態にあり、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を持つDNA断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定し、検出する方法に利用される。形成されたハイブリッドの検出手段としては、DNA断片試料に予め結合させた蛍光標識あるいは放射性標識を利用する方法、そしてハイブリッド構造内に取り込まれる蛍光発生基もしくは導電性基を持つインターカレータを利用する方法などが知られている。

【0003】DNAチップの作製方法として、予め調製したDNA断片を固相担体表面に点着して固定する方法が知られている。その方法は、DNA断片の種類や固相担体の種類に応じて異なるが、(1) cDNAやPCR産物をポリ陽イオンで表面処理した固相担体表面に点着し、DNA断片の荷電を利用して固相担体にイオン結合させる方法 (Schena, M. et al., Science, 270, 467-470(1995)およびShalon, D. et al., Genome Res., 6, 639-645(1996))、および(2) 反応性基で修飾した合成オリゴヌクレオチドを表面処理した固相担体表面に点着し、共有結合させる方法 (「蛋白質・核酸・酵素」, 43巻、(1998), 2004-2011, Lamture, J. B. et al., Nucleic Acids Res., 22, 2121-2125, 1994, およびGuo, Z., et al., Nucl. Acids Res., 22, 5456-5465, 1994) が実用されている。上記の(1)の方法は、イオン結合による固定方法であるため、一度固定されたDNA断片の安定性を補強するため、紫外線や熱による処理をさらに行うこともできる。一般に、塩基数が50以上の長鎖のDNA断片は、その一端ではなく、DNA断片が有する複数の電荷を利用して、多点でイオン結合により固相担体に固定される。

【0004】DNA断片をイオン結合によって固相担体に固定させる場合には、DNA断片の点着は通常二本鎖DNA断片を用いて行われる。そして、二本鎖DNA断片を固定後に、熱、イオン強度、尿素の添加などの条件(変性処理の条件)を付与することによって、二本鎖DNA断片を解離させ、一本鎖DNA断片のみを固定させる。しかし、二本鎖DNA断片は、何れの鎖も多点で固

定されるため、変性処理後に、対象とする一方の鎖のみを固定し、他方の鎖を選択的に排除することが非常に困難である。

【0005】二本鎖DNA断片を共有結合によって固定する場合には、二本鎖の内の一方の鎖の末端部に予め導入した反応性基と固相担体上の反応性基との共有結合によるため、変性処理後、対象とする一方の鎖のみを固定させることが可能である。共有結合によってPCR産物が固定されたDNAチップを、試料DNA断片とのハイブリダイゼーションに供することによって、DNAチップ上のcDNAに相補性を有する試料DNA断片を検出する方法が知られている(図2)。この方法で使用するDNAチップ(b2)は、二本鎖のcDNA(2)が結合基-L<sup>0</sup>-を介して、基板(1)表面に固定されたもの(b1)を変性処理することのみによって作製されたものであり、解離した一本鎖のcDNA(4)は反応系外に除かれていない。従って、ハイブリダイゼーションの際に、解離したcDNA断片と試料DNA断片(5)とは、DNAチップ上に固定されたcDNAに対して競合すると考えられる。そのため、このDNAチップを用いるハイブリダイゼーションでは、その効率の低下を招くという問題点を生じる。

【0006】国際公開出願明細書(WO98/1896)には、上記記載の方法において、結合基-L<sup>0</sup>-として、PDC(p-フェニレンジチオイソシアナート)より誘導される基を選択し、かつ、解離した一本鎖のcDNAを反応系外へ除去することを特徴とする非競合型の方法が開示されている。また、二本鎖のcDNAの変性処理および当該一本鎖のcDNAの除去については、95℃の沸騰水を用いることによって行っている。しかし、PDCを用いる二本鎖のcDNAの固定は、その反応が遅いという問題点を有する。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、基板表面に一本鎖のDNA断片をジスルホン化合物を用いて共有結合によって固定する方法、DNAチップ、およびDNAチップを用いる非競合型のハイブリダイゼーションによって試料核酸断片を検出する方法を提供することを、その課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、(1)表面に反応性基が導入された基板上に、一方の末端部に反応性基を有する一本鎖のDNA断片と反応性基を有しない一本鎖のDNA断片とからなる二本鎖のDNA断片を含む水性液を接触させることによって、基板表面の反応性基と該二本鎖のDNA断片の内の一方のDNA断片が有する反応性基とを反応させて共有結合を形成させることにより、該二本鎖のDNA断片を基板表面に固定する工程；(2)該二本鎖のDNA断片から反応性基を有しない一本鎖のDNA断片を遊離させる工程；そして、

(3)遊離した一本鎖のDNA断片を除去する工程を含む、反応性基を有する一本鎖のDNA断片をその末端部にて基板表面に固定する方法であって、上記工程(1)において、該二本鎖のDNA断片を、結合基： $-R^3R^2C-R^1HC-SO_2-L-SO_2-CHR^1-CR^2R^3-$ 、結合基： $-R^3R^2C-R^1HC-SO_2-L-SO_2-(CR^1R^2)_n-$ 、あるいは結合基： $-(R^2R^1C)_n-SO_2-L-SO_2-(CR^1R^2)_n-$  [式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、および炭素原子数が6乃至20のアリール基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表し；nは、1乃至6の整数を表し；そして、Lは、二価の連結基を表す]を介して基板表面に結合させることを特徴とする固定方法にある。

【0009】本発明の固定方法の好ましい態様は以下の通りである。

(イ)一方の末端部に反応性基を有する一本鎖のDNA断片および反応性基を有しない一本鎖のDNA断片として、共に、塩基数が50乃至100000の範囲にあるものを用いる。

(ロ)一本鎖のDNA断片が有する反応性基がアミノ基である。

【0010】本発明は、また、上記記載の本発明の固定方法によって作製されたDNAチップにもある。

【0011】本発明は、さらに、上記記載の本発明のDNAチップの表面に、蛍光物質で標識した核酸断片を含む水性液を付与し、DNAチップ上のDNA断片と蛍光物質で標識した試料核酸断片とのハイブリッドを形成させ、そして、蛍光物質から発生する蛍光を検出することを特徴とする、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する試料核酸断片を検出する方法にもある。

【0012】本発明は、さらにまた、前記記載の本発明のDNAチップの表面に、蛍光発生基を有するインターカレータと試料核酸断片とを含む水性液を付与し、DNAチップ上のDNA断片と試料核酸断片とのハイブリッドを形成させ、そして、該ハイブリッド構造内に取り込まれたインターカレータの蛍光発生基から発生する蛍光を検出することを特徴とする、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する試料核酸断片の検出方法にもある。本明細書では、塩基数が1乃至9の範囲にあるDNA断片をオリゴヌクレオチド、10乃至49の範囲にあるDNA断片をポリヌクレオチドとし、ポリヌクレオチドより長鎖のDNA断片とは、塩基数が50以上のDNA断片をいう。

【0013】

【発明の実施の形態】図1に、本発明の代表的なDNAチップ、代表的なDNAチップの製造方法を表す工程、および代表的な試料核酸断片の検出方法を示す。

【0014】本発明のDNAチップの製造方法では、まず、基板(1)表面に反応性基D<sup>1</sup>が導入された修飾基

板(a0)に二本鎖のDNA断片(2)を接触することによって、二本鎖の内の一方のDNA断片(3)の末端部に導入されている反応性基D<sup>2</sup>と基板表面に導入されている反応性基D<sup>1</sup>とをスペーサを介して共有結合させることにより、二本鎖のDNA断片を基板表面に固定する。二本鎖のDNA断片は、反応性基D<sup>2</sup>を有するDNA断片(3)と反応性基を有しないDNA断片(4)とで形成されている。次いで、固定されている二本鎖のDNA断片に変性処理を施すことによって、二本鎖の内の他方のDNA断片(4)を解離させると共に、反応系から除外する。結合基-L<sup>0</sup>-は、スペーサ、反応性基D<sup>1</sup>および反応性基D<sup>2</sup>から形成される結合基を示す。上記の工程によって製造される本発明のDNAチップ(a3)は、一方のDNA断片(3)のみがその末端部にて固定されてなるチップである。

【0015】本発明において、「DNAチップ」とは、一本鎖のDNA断片がその末端部にて共有結合で固定されてなる基板をいい、固定されているDNA断片の種類は問わない。従って、一本鎖のcDNAが固定されていても、DNAチップという。「末端部」とは、末端部の付近をも含むものとする。一本鎖のDNA断片の種類は、一種類であっても二種類以上であってもよい。二種類以上の場合には、アレイ状にDNA断片(厳密には、複数のDNA断片で構成されている一つの領域)が整列していることが好ましい。

【0016】本発明の試料核酸断片の検出方法は、本発明のDNAチップ(a3)上に標識物質(6)を有する試料核酸断片(5)を接触させ、DNAチップ(a3)上に固定されている一本鎖のDNA断片と標識された試料核酸断片(5)とのハイブリッドを形成させ、標識量を検出する方法である。図1には、形成されたハイブリッド(a4に該当)を、試料核酸断片が有する蛍光物質の蛍光量を測定することによって検出する代表例を示す。

【0017】[基板] 基板としては、疎水性、あるいは親水性の低い担体であることが好ましい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低いものであっても好ましく用いることができる。固相担体の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、繊維物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルター等の多孔質物質などを挙げることができる。多孔質物質の細孔の大きさは、2乃至1000nmの範囲にあることが好ましく、2乃至500nmの範囲にあることが特に好ましい。基板の材質は、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による

解析の容易さによるものである。基板の厚さは、100乃至2000μmの範囲にあることが好ましい。

【0018】ポリ陽イオンで処理がされた基板表面に、さらに電荷を有する親水性高分子等からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような層を設けることによって、ポリ陽イオン処理がされた基板の凹凸を軽減することができる。基板の種類によっては、その担体中に親水性高分子等を含有させることも可能であり、このような処理を施した基板も好ましく用いることができる。

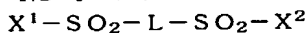
【0019】基板は、二本鎖のDNA断片を固定させるため、その表面に反応性基D<sup>1</sup>を有しているが、反応性基D<sup>1</sup>は、基板表面をポリ陽イオン(例えば、ポリーレーリシン、ポリエチレンイミンもしくはポリアルキルアミンであることが好ましく、ポリーレーリシンであることが特に好ましい)で被覆処理することによって導入されたものであっても、または反応性基D<sup>1</sup>を有するシランカップリング剤を基板表面に接触させることによって導入されたものであってもよい。反応性基D<sup>1</sup>は、反応性基D<sup>1</sup>を有するシランカップリング剤を基板表面に接触させることによって導入されたものであることが特に好ましい。反応性基D<sup>1</sup>は、スペーサとなる化合物が有する反応性基の一部と反応できる基であれば何であってよい。このような反応性基D<sup>1</sup>としては、アミノ基、メルカプト基、アルデヒド基、エポキシ基、カルボキシル基もしくは水酸基であることがより好ましく、アミノ基もしくはメルカプト基であることが特に好ましい。上記のポリ陽イオンによる被覆処理では、反応性基D<sup>1</sup>は、アミノ基である。

【0020】アミノ基を有するシランカップリング剤としては、具体的には、γ-アミノプロピルトリエトキシシラン、N-β(アミノエチル)γ-アミノプロピルトリメトキシシランおよびN-β(アミノエチル)γ-アミノプロピルメチルジメトキシシランを挙げることができる。γ-アミノプロピルトリエトキシシランを用いることが特に好ましい。

【0021】[スペーサ] 反応性基D<sup>1</sup>と反応性基D<sup>2</sup>との共有結合は、スペーサを介して形成される。スペーサとしては、下記式(I)で表されるジスルホン化合物を用いる。

【0022】

[化1] (I)



【0023】上記式中、X<sup>1</sup>は、-(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>n</sub>-Yを表し、X<sup>2</sup>は、-CR<sup>1</sup>=CR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>、または-(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>n</sub>-Yを表す。X<sup>2</sup>が-(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>n</sub>-Yを表すとき、X<sup>1</sup>およびX<sup>2</sup>は、互いに同一の基であっても、異なる基であってもよい。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基および炭素原子数が6乃至20のアリール基からなる群

より選ばれる原子もしくは基を表す。炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基としては、メチル基、エチル基、 $n$ -プロピル基、 $n$ -ブチル基、もしくは $n$ -ヘキシル基であることが好ましく、メチル基であることが特に好ましい。上記アリール基としては、フェニル基もしくはナフチル基であることが好ましく、フェニル基であることが特に好ましい。 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ は、共に、水素原子であることが好ましい。 $n$ は、1 乃至 6 の整数を表し、好ましくは 2 を表す。 $Y$ は、 $-OH$ 、 $-OR^0$ 、 $-SH$ 、 $NH_3$ 、 $NH_2R^0$ 等 (但し、 $R^0$ は、水素原子を除く基とする。) の求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「 $HY$ 」として脱離する基を表す。 $Y$ は、ハロゲン原子 ( $F$ 、 $Cl$ 、 $Br$  等)、 $-OSO_2-$ 炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基、 $-OSO_2-$ 炭素原子数が 6 乃至 20 のアリール基、 $-OSO_3M$ 、 $-OCO-$ 炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基、 $-OCO-$ 炭素原子数が 1 乃至 6 のハロゲン化アルキル基、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基を有する炭素原子数が 7 乃至 26 のアラルキル基、 $-NH-$ 炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキレン基 $-OSO_3M$ 、および置換基を有していてもよい四級ピリジニウム基からなる群より選ばれる原子もしくは基であることが好ましい。上記アルキル基、アリール基、アルキレン基、アラルキル基およびハロゲン化アルキル基は、さらに置換されていてもよい。四級ピリジニウム基が有していてもよい置換基としては、 $-アルキレン基-SO_3^-$ および $-NH-アルキレン基-SO_3^-$ を挙げることができる。これらのアルキレン基としては、メチレン基もしくはエチレン基であることが好ましい。四級ピリジニウム基は、ハロゲン化酸塩を形成していてもよく、塩酸塩であることが特に好ましい。 $M$ は、水素原子、アルカリ金属原子 (ナトリウム原子、カリウム原子等) および置換基を有していてもよいアンモニウムカチオンからなる群より選ばれる原子もしくはカチオンを表す。置換基を有していてもよいアンモニウムカチオンとしては、 $NH(C_2H_5)_3$ 、 $NH(CH_2CH_2OHCH_3)_3$ 、 $NH_3C_2H_5$ 、 $NH_3(n-C_3H_7)$ 、 $NH_3(n-C_4H_9)$ 、 $NH_2(C_2H_2OH)_2$ 、 $NH_2(C_2H_5)_2$ 、 $NH_2(i-C_3H_7)_2$ 、 $NH_2(n-C_3H_7)_2$ 、 $NH_2CH_3(n-C_4H_9)$ 、 $NH_2(C_2H_5)_2$ 、 $NH_2(n-C_4H_9)_2$ 、 $NHC_2H_5(i-C_3H_7)_2$ 、もしくは $NHCH_3(n-C_4H_9)_2$ を挙げることができる (但し、窒素原子が有する静電荷 (+) を

省略する)。Mは、ナトリウム原子、もしくはカリウム原子であることが特に好ましい。

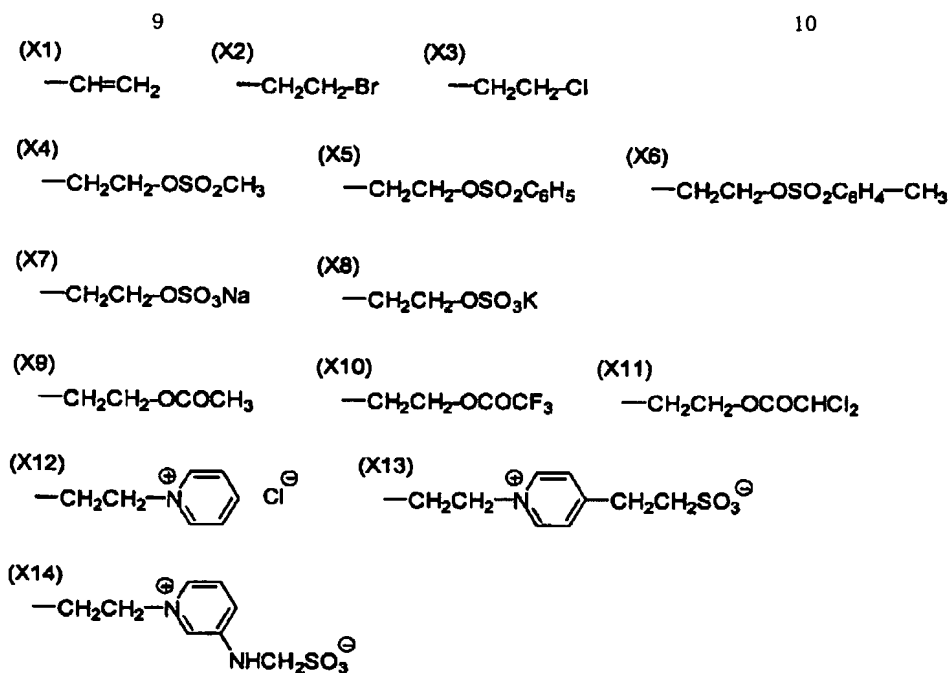
【0024】Lは、二価の連結基を表す。二価の連結基は、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキレン基、炭素原子数が 3 乃至 16 の脂肪族環基、炭素原子数が 6 乃至 20 のアリーレン基、N、S および P からなる群より選ばれるヘテロ原子を 1 乃至 3 個含む炭素原子数が 2 乃至 20 の複素環基、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-SO_3-$ 、 $-NR^{11}-$ 、 $-CO-$ およびこれらの組み合わせから群より選ばれる基の一つあるいは複数個組み合わせる基であることが好ましい。 $R^{11}$ は、水素原子、炭素原子数が 1 乃至 15 のアルキル基、炭素原子数が 6 乃至 20 のアリール基、および炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基を有する炭素原子数が 7 乃至 21 のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基であることが好ましく、水素原子もしくは炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基であることがさらに好ましく、水素原子、メチル基もしくはエチル基であることが特に好ましい。Lが $-NR^{11}-$ 、 $-SONR^{11}-$ 、 $-CONR^{11}-$ 、 $-NR^{11}COO-$ 、および $-NR^{11}CONR^{11}-$ からなる群より選ばれる基を二個以上組み合わせる基である場合には、それらの $R^{11}$ 同士が結合して環を形成していてもよい。

【0025】上記アルキレン基、脂肪族環基、アリーレン基、 $R^{11}$ のアルキル基、 $R^{11}$ のアリール基、および $R^{11}$ のアラルキル基は、置換されていてもよい。このような置換基としては、水酸基、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルコキシ基、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルケニル基、炭素原子数が 2 乃至 7 のカルバモイル基、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基、炭素原子数が 2 乃至 7 のアラルキル基、炭素原子数が 6 乃至 20 のアリール基、スルファモイル基 (もしくはそのNa塩、K塩等)、スルホ基 (もしくはそのNa塩、K塩等)、カルボン酸基 (もしくはそのNa塩、K塩等)、ハロゲン原子、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルケニレン基、炭素原子数が 6 乃至 20 のアリーレン基、スルホニル基、およびこれらの組み合わせからなる群より選ばれる原子もしくは基を挙げることができる。

【0026】上記 $X^1$ および $X^2$ の好ましい具体例を以下に示す。

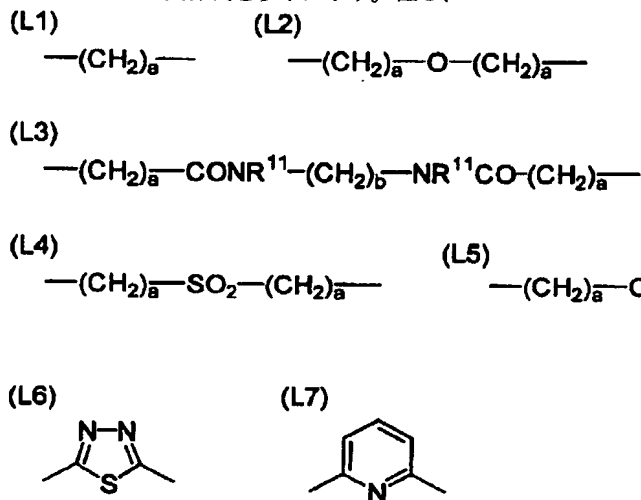
【0027】

【化2】



【0028】 $X^1$ および $X^2$ は、上記具体例の中で、互いに独立に、(X1)、(X2)、(X3)、(X4)、(X7)、(X8)、(X13)あるいは(X14)であることが好ましく、(X1)あるいは(X2)であることがさらに好ましく、(X1)であることが特に好ましい。

【0029】Lの好ましい具体例を以下に示す。但し、



【0031】Lとしては、上記記載の二価の連結基の他に、上記アルキレン基の水素原子が $-\text{SO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 基によって置換されてなる基も好ましい。

【0032】本発明で好ましく用いる一般式(I)で表

aは、1乃至6の整数であり、1もしくは2であることが好ましく、1であることが特に好ましい。bは、0乃至6の整数であり、2もしくは3であることが好ましい。

【0030】

【化3】

されるジスルホン化合物の代表例を下記に示す。

【0033】

【化4】

(S1)



(S2)



(S3)



(S4)



(S5)



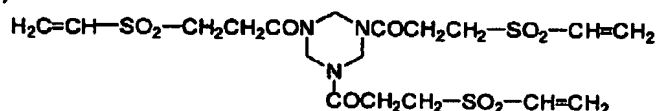
(S6)



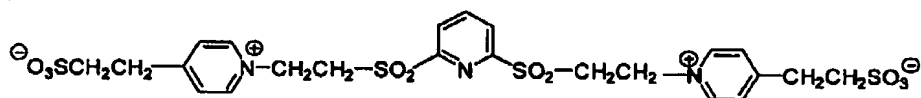
(S7)



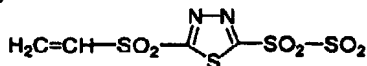
(S8)



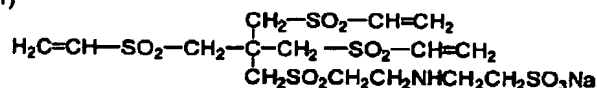
(S9)



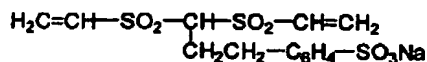
(S10)



(S11)



(S12)



【0034】本発明で用いる一般式(1)で表されるジスルホン化合物の合成法については、特公昭47-2429号、同50-35807号、特開昭49-24435号、同53-41551号、同59-18944号等の各公報に詳細が記載されている。

【0035】本発明で用いられる一般式(1)で表されるジスルホン化合物は、二種類以上を混合して用いてもよい。

【0036】基板表面に導入された反応性基D<sup>1</sup>と二本鎖のDNA断片が有する反応性基D<sup>2</sup>とのスペーサを介した共有結合の形成については、a) 反応性基D<sup>1</sup>とス

ペーサが有する反応性基との間で形成される共有結合、およびb) 反応性基D<sup>2</sup>とスペーサが有する反応性基との間で形成される共有結合の順を問わない。従って、基板にスペーサを接触させて、まずスペーサを基板に結合させ、次いで、ここにDNA断片を接触させてスペーサにDNA断片を結合させることも好ましく(図1に該当)、スペーサにDNA断片を接触させて、まずスペーサにDNA断片を結合させてから、これを基板に接触させることも好ましく、または基板、スペーサおよびDNA断片を実質的に同時に接触させることも好ましい。ここで、上記a)は、一般式(1)中のX<sup>1</sup>もしくはX<sup>2</sup>の



—CR<sup>1</sup>=CR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>基に、反応性基D<sup>1</sup>を付加させて得られる結合、またはX<sup>1</sup>もしくはX<sup>2</sup>の—Y基に反応性基D<sup>1</sup>を置換させて得られる結合である。上記b)については、a)と同様である。従って、図1において、結合基—L<sup>0</sup>—とは、結合基：—R<sup>3</sup>R<sup>2</sup>C—R<sup>1</sup>HC—SO<sub>2</sub>—L—SO<sub>2</sub>—CHR<sup>1</sup>—CR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>—、結合基：—R<sup>3</sup>R<sup>2</sup>C—R<sup>1</sup>HC—SO<sub>2</sub>—L—SO<sub>2</sub>—(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>n</sub>—、あるいは結合基：—(R<sup>2</sup>R<sup>1</sup>C)<sub>n</sub>—SO<sub>2</sub>—L—SO<sub>2</sub>—(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>n</sub>—を含む基を表す。

【0037】[DNA断片の点着] 本発明のDNAチップは、主に、遺伝子の発現態様(特定の遺伝子の発現量、発現した遺伝子の種類など)を調べるために用いられる。従って、基板表面に固定する二本鎖のDNA断片は、mRNAに対してRT(reverse transcription)法によって得たcDNA断片をベクターに組み込んだもの(cDNAのライブラリ)をテンプレートとしてPCR法によって増幅して調製することが好ましい。一本鎖のcDNA断片をPCR法により増幅して得られる二本鎖のcDNA断片は、一方の鎖がその末端部に反応性基R<sup>2</sup>を持ち、かつ他方の鎖が反応性基を持たないものであり、これは、一般的に、二種類のプライマ(反応性基R<sup>2</sup>を5'末端に有するプライマと反応性基を有しないプライマ)を用いて調製することができる。反応性基D<sup>2</sup>としては、アミノ基、イミノ基、ヒドラジノ基、カルバモイル基、ヒドラジノカルボニル基、もしくはカルボキシイミド基であることが好ましく、アミノ基であることが特に好ましい。固定の様式は、PCR法によって得られた二本鎖のcDNA断片の一方の鎖の末端部(好ましくは、5'末端)に有する反応性基D<sup>2</sup>と基板表面に導入された反応性基D<sup>1</sup>との共有結合によって行うことが好ましい。実際の固定は、cDNA断片が分散または溶解してなる水性液を基板表面に点着することによって実施することが好ましい。cDNA断片の塩基数は、50乃至100000の範囲にあることが好ましく、50乃至10000の範囲にあることがより好ましく、50乃至1000の範囲にあることが特に好ましい。本発明では、オリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドではなく、長鎖のDNA断片を固定の対象とする。

【0038】二本鎖のcDNA断片が分散または溶解してなる水性液を基板表面に点着する際には、この水性液から反応性基D<sup>2</sup>を有するプライマを除去しておくことが好ましい。通常、その水性液中には、二本鎖のcDNA断片の他に、未反応の反応性基D<sup>2</sup>を有するプライマが含まれており、特にその未反応の反応性基R<sup>2</sup>を有するプライマを除去することなく、点着に使用すると該プライマも基板表面上の反応性基D<sup>1</sup>と反応して固定されることになってしまうためである。除去の方法としては、市販のスピンカラム・ガラスフィルタを用いる濾過またはイソプロパノール沈殿もしくはエタノール沈殿を挙げることができる。

【0039】基板表面に反応性基D<sup>2</sup>を有するDNA断片を点着させると、基板表面にはDNA断片が結合していない未反応の反応性基D<sup>1</sup>も存在する。このような反応性基R<sup>2</sup>は、標識された試料核酸断片とのハイブリダイゼーションにおいて非特異的な結合を生じる可能性があるため、予めこのような反応性基D<sup>1</sup>をマスク処理しておくことが好ましい。マスク処理は、基板表面に、アミノ基もしくはメルカプト基を有するアニオン性化合物を接触させることによって行うことが好ましい。このようなアニオン性化合物としては、反応性基D<sup>1</sup>と反応し、かつ負の電荷(COO<sup>-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>、PO<sub>3</sub><sup>-</sup>、もしくはPO<sub>2</sub><sup>-</sup>)を有するものであれば何れのものも用いることができるが、アミノ酸であることが好ましく、グリシンもしくはシステインであることが特に好ましい。また、タウリンも好ましく用いることができる。

【0040】[変性処理] 基板表面に固定された二本鎖のDNA断片を解離させる変性処理の方法としては、公知の方法を用いることができる。熱処理、高いpHやイオン強度の低い水性溶媒での処理、または界面活性剤、有機溶剤(アルコール、アルデヒドなど)もしくは尿素やアミドの添加処理を挙げることができるが、操作の簡便さの点や特定のDNA断片についてはその融解温度(T<sub>m</sub>)が既知であるという点から、熱処理あるいは水性溶媒のpHを上げる方法を用いることが好ましい。

【0041】水性溶媒としては、蒸留水、またはクエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等の一般的な緩衝液、これらの緩衝液に電解質を添加したもの、あるいはさらに、ジメチルスルホキシドのような二本鎖の結合状態に影響を与えない有機溶媒を添加したものをを用いることが好ましい。

【0042】二本鎖の結合状態に影響を与える水性溶媒の接触は、二本鎖のDNA断片が固定された基板を、所定の温度に設定した水性溶媒に接触(好ましくは、浸漬)させることによって実施することが好ましい。所定の温度とは、二本鎖のDNA断片をほぼ完全に解離させるために、約90乃至100℃の範囲にあることが好ましい。接触は、3乃至60分間の範囲にて行うことが好ましく、15乃至30分間の範囲にて行うことが特に好ましい。イオン強度を利用する場合には、緩衝液に添加する電解質(例えば、塩化カリウム)の濃度が0.1乃至0.9Mの範囲にある緩衝液を用いることが好ましく、0.3乃至0.7Mの範囲にある緩衝液を用いることが特に好ましい。pHを利用する場合には、約11にて行うことが好ましい。

【0043】[核酸断片試料] 試料核酸断片は、遺伝子発現を調べる目的では、真核生物の細胞や組織からmRNAを抽出し、逆転写反応により蛍光標識されたdNTPを取り込ませて、標識cDNAとしたものをを用いることが好ましい。一方、mRNAそのものを蛍光標識して用いることも好ましい。

【0044】[ハイブリダイゼーション] ハイブリダイゼーションは、本発明のDNAチップに、蛍光物質で標識された試料核酸断片が溶解または分散してなる水性液を接触させることによって、あるいは蛍光発生基を有するインターカレータの存在下、非標識の試料核酸断片が溶解または分散してなる水性液を接触させることによって行うことが好ましい。上記後者の場合には、蛍光インターカレータは、ハイブリダイゼーションの終了後に、形成されたハイブリッドDNAに接触させても、ハイブリダイゼーションの際に試料核酸断片を含む水性液中に蛍光インターカレータを含めることによって、形成されるハイブリッドDNAに接触させてもよい。ハイブリダイゼーションの終了後に接させる場合には、蛍光インターカレータが、(一本鎖の)試料核酸断片あるいは試料中に含まれる二本鎖の試料核酸断片に非特異的に結合するのを避けるため、ハイブリダイゼーション終了後に未反応の試料核酸断片を除去してから、接触させることが望ましい。洗浄には、界面活性剤(好ましくは、ドデシル硫酸ナトリウム)と緩衝液(好ましくは、クエン酸緩衝液)との混合溶液を用いることが好ましい。蛍光インターカレータは、何れも10nM乃至10mMの濃度範囲にて用いることが好ましい。ハイブリダイゼーションは、室温乃至70℃の温度範囲で、そして0.5乃至20時間の範囲で実施することが好ましい。

【0045】ハイブリダイゼーション中の乾燥を防ぐために、試料核酸断片を含む水性液に、高沸点の物質を添加してもよい。高沸点の物質としては、試料核酸断片を含む水性液に溶解し得るものであって、ハイブリダイゼーションを妨げることがなく、かつ粘性の大きくない物質であることが好ましい。このような物質としては、グリセリン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシドおよび低分子の親水性ポリマーを挙げることができる。低分子の親水性ポリマーとしては、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸ナトリウム等を挙げることができる。高沸点の物質の濃度は、試料核酸断片を含む水性液中、0.1乃至2容量%の範囲にあることが好ましく、0.5乃至1容量%の範囲にあることが特に好ましい。低分子の親水性ポリマーについては、特願平11-30429号の明細書に詳細が記載されている。また、同じ目的のために、ハイブリダイゼーション中のDNAチップを、90%以上の湿度および25乃至50℃の温度範囲の環境に置くことも好ましい。

【0046】DNAチップ上の一本鎖のcDNA断片と試料核酸断片とで形成されるハイブリッドの検出は、蛍

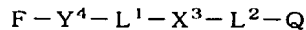
光発生基を有するインターカレータ(以下、「蛍光インターカレータ」という。)あるいは試料核酸断片を標識している蛍光物質から発せられる蛍光量を測定することによって行う。

【0047】[蛍光物質] 蛍光物質としては、試料核酸断片の核酸塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素(例えば、Cy Dye<sup>TM</sup>シリーズのCy 3、Cy 5等)、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N<sup>2</sup>-アセチルアミノフルオレン(AAF)あるいはAAIF(AAFのヨウ素誘導体)を使用することができる。

【0048】[蛍光発生基を有するインターカレータ] 蛍光インターカレータとしては、文献(Bull. Chem. Soc. Jpn., 72, 327-337(1999))に記載のものを用いることができる。この他のものとしては、水溶性縫い込み型蛍光インターカレータであって、下記一般式(I I)で表されるものも好ましく用いることができる。下記式で表される蛍光インターカレータは蛍光性基(F)を一つのみ有する。

【0049】

【化5】(I I)



【0050】上記式中、X<sup>3</sup>は、蛍光インターカレータのコア部分であり、置換基を有していてもよい二価の環状基を表す。二価の環状基としては、平面性を有する環状基であることが好ましく、二つの窒素原子に結合手を有するナフタレンジイミド基、2位と6位もしくは1位と5位(好ましくは、2位と6位)とに結合手を有するアントラセン基、アントラセン基と同じ位置に結合手を有するアントラキノ基、2位と6位とに結合手を有するフルオレン基、2位と6位とに結合手を有するピフェニレン基、2位と7位とに結合手を有するフェナントレン基、および2位と7位とに結合手を有するピレン基からなる群より選ばれる環状基であることが好ましく、二つの窒素原子に結合手を有するナフタレンジイミド基であることが特に好ましい。置換基としては、ハロゲン原子、あるいは炭素原子数が1乃至6のアルキル基であることが好ましいが、水素原子であることが好ましい。炭素原子数が1乃至6のアルキル基としては、メチル基、エチル基、もしくはn-プロピル基であることが好ましい。

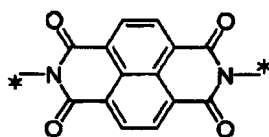
【0051】X<sup>3</sup>の具体例を次に示す。\*印は、結合手の位置を示す。

【0052】

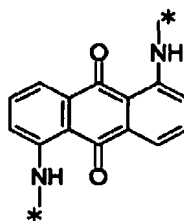
【化6】

17

(X1)

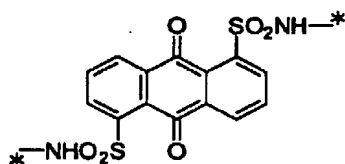


(X2)



18

(X3)



【0053】Fは、蛍光性基（一つの結合手を有する蛍光発生物質）を表す。蛍光発生物質は、特定の波長、例えば、波長が400乃至700nmの範囲（好ましくは、400乃至550nmの範囲）にある励起光の照射によって蛍光を発する物質であることが好ましい。このような蛍光発生物質としては、インドシアニン系化合物、アザインドレニンシアニン系化合物、アクリジン系化合物、および溝結合型化合物（groove binder）を挙げることができる。ここで、溝結合型化合物とは、一般的に、その分子内に四級カチオン性基を有し、そのカチオン性基の存在によって、二本鎖核酸断片のリン酸エス

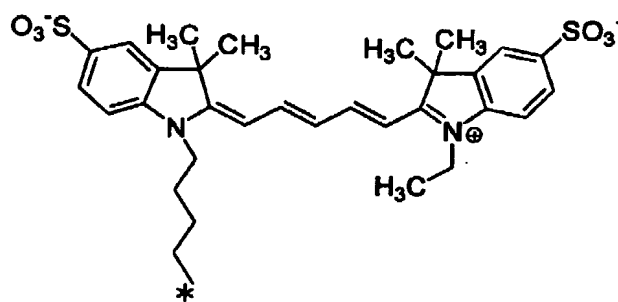
(F1)

テル基のアニオンと強く相互作用する化合物をいう。溝結合型化合物は、そのコア部分（X<sup>3</sup>）と蛍光性基（F）とが塩基対を介して積層した状態で二本鎖核酸断片に取り込まれる。

【0054】下記に、インドシアニン系化合物（F1）、アザインドレニンシアニン系化合物（F2）、アクリジン系化合物（F3）、および溝結合型化合物（F4）の具体例をこの順に、一つの結合手を有する構造として示す。結合手の位置を\*印で示す。

【0055】

【化7】

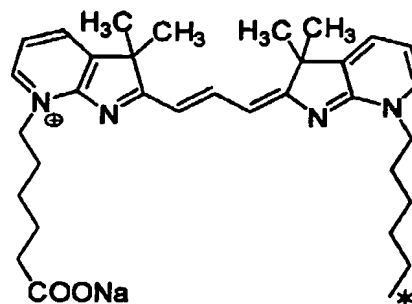


【0056】

【化8】

(F2)

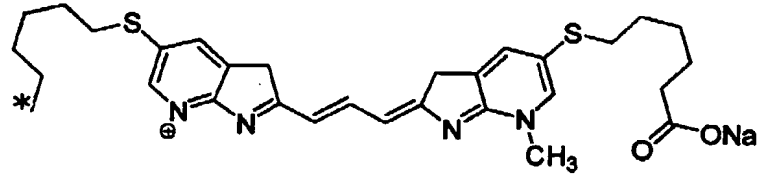
40



50 【0057】

【化9】

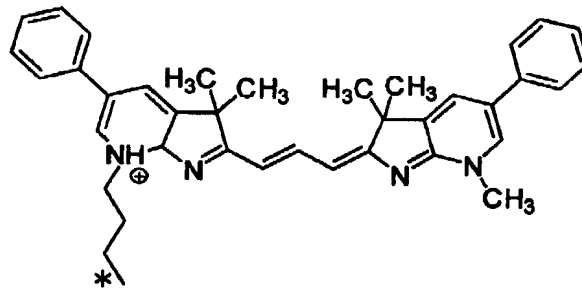
(F2)



【0058】

【化10】

(F2)

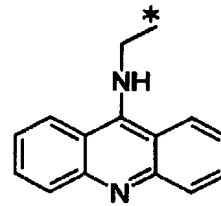
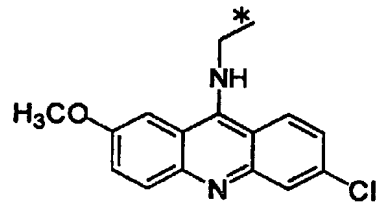


【0059】

【化11】

(F3)

(F3)

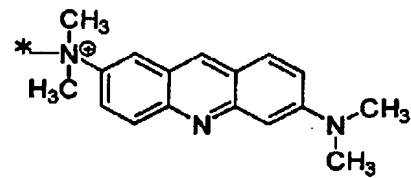
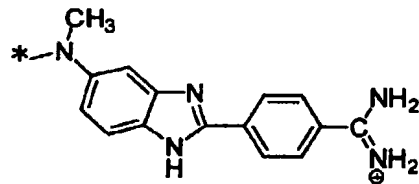


【0060】

【化12】

(F4)

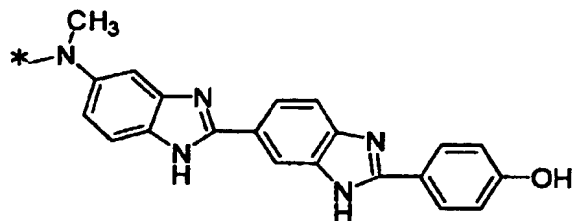
(F4)



【0061】

【化13】

(F4)

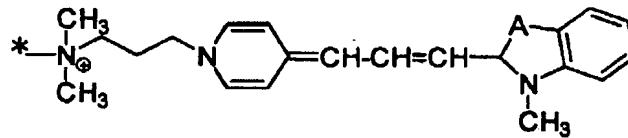


【0062】

【化14】

21  
(F4)

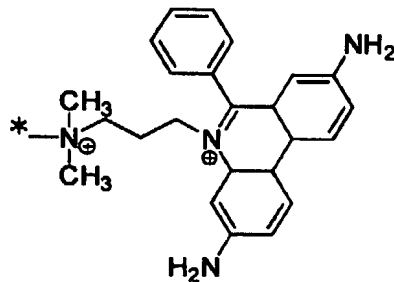
22



【0063】

【化15】

(F4)



【0064】上記式中、Aは、酸素原子あるいはイオウ原子を示す。

【0065】 $L^1$ および $L^2$ は、互いに独立に、蛍光インターカレータに可溶性を付与する二価の連結基であることが好ましく、その直鎖部分が炭素原子数が3乃至10の炭化水素基に相当する長さを有する基であることが好ましい。ここで、直鎖部分とは、 $L^1$ に関しては、その一方の端部がコア部分( $X^3$ )と縮合し、かつ他方の端部がYと縮合する部分、 $L^2$ に関しては、その一方の端部がコア部分( $X^3$ )と縮合し、かつ他方の端部がZと縮合する部分をいう。 $L^1$ および $L^2$ は、調製の都合上、互いに同一の基であることが好ましい。 $L^1$ は、二価の連結基中に、アルキレン基と、窒素原子を有する二価の基を含む連結基であることがさらに好ましい。窒素原子を有する二価の基は、 $L^1$ の直鎖部分に含むことが好ましい。窒素原子を有する二価の基としては、イミノ基、1,4-ピペラジニル基、1,3-イミダゾリジニル基、ピロリジニル基、二価のピラゾリジニル基、あるいは二価のピペリジニル基であることが好ましく、イミノ基、あるいは1,4-ピペラジニル基であることが特に好ましい。

【0066】窒素原子は、炭素原子数が1乃至3のアルキル基、炭素原子数が2乃至4のアシル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基および炭素原子数が1乃至3のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至23のアラルキル基からなる群より選ばれる基で置換されていてもよい。炭素原子数が1乃至3のアルキル基としては、メチル基もしくはエチル基であることが好ましく、メチル基であることが特に好ましい。炭素原子数が2乃至4のアシル基としては、アセチル基であることが好ましい。炭素原子数が6乃至20のアリール基としては、フェニル

基もしくはナフチル基であることが好ましく、フェニル基であることが特に好ましい。炭素原子数が1乃至3のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至23のアラルキル基としては、ベンジル基であることが好ましい。イミノ基の置換基としては、メチル基であることが特に好ましい。従って、 $L^1$  (もしくは $L^2$ ) は、N-メチルージ(n-プロピレニル)イミノ基、1,4-ジ(n-プロピレニル)-ピペラジニル基であることがさらに好ましく、N-メチルージ(n-プロピレニル)イミノ基であることが特に好ましい。

【0067】 $Y^4$ は、二価の連結基を表し、イミノ基、チオエーテル基、カルボニルオキシ基、チオカルボニルオキシ基もしくはカルボニル基であることがより好ましく、イミノ基、チオエーテル基もしくはカルボニル基であることがさらに好ましく、イミノ基であることが特に好ましい。

【0068】Qは、非蛍光性基を表し、アミノ基、カルボン酸基、スルホン酸基、スルフィン酸基、スルフェン酸基、ヒドラジノ基、カルバモイル基、水酸基、イミノ基およびメルカプト基からなる群より選ばれる基であることが好ましく、アミノ基、カルボン酸基、スルホン酸基あるいはメルカプト基であることがより好ましく、アミノ基であることが特に好ましい。

【0069】蛍光インターカレータは、水溶性であることが必要とされるが、インターカレータに水溶性を付与するために、前記記載のように、 $L^1$ や $L^2$ に可溶性を付与する基を含めることも好ましいが、インターカレータの塩として用いてもよい。塩としては、塩酸塩、硫酸塩、炭酸塩、リン酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩等の無機塩との酸付加塩、あるいは酢酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩等の有機酸との付加塩、またはナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等の無機塩類、あるいはピリジニル塩、アンモニウム塩、トリエチルアミン塩、エタノールアミン塩等の有機塩類を挙げることができる。

【0070】蛍光インターカレータは、公知の方法(特開平9-288080号公報)によって簡便に製造することができる。この方法では、蛍光性基が二つ導入されたものも得られるが、反応条件を変えて、あるいは反応生成物の分離精製を行って本発明の蛍光インターカレータのみを得ることができる。

【0071】【蛍光量の測定】DNAチップ上の一本鎖

のcDNA断片と試料核酸断片とで形成されるハイブリッドの検出は、蛍光発生基を有するインターカレータ（以下、「蛍光インターカレータ」という。）あるいは試料核酸断片を標識している蛍光物質から発せられるの蛍光量を測定することによって行う。蛍光量の測定は、蛍光レーザースキャナー法や冷却CCD（電荷結合素子）法によって行うことが好ましい。

【0072】本発明の試料核酸断片の検出方法は、例えば、酵母の野生型株、および酵母のTUP1欠損株からそれぞれ抽出したmRNAを用いて蛍光標識した試料cDNA断片を調製し、次いで、酵母の約数千個の全遺伝子を配置したDNAチップに対して、各試料cDNA断片を用いてそれぞれハイブリダイゼーションを行い、mRNAの発現量を解析することに利用できる。実際に、イオン結合によってPCR産物が固定されているDNAチップを用いて、野生型株から得られた試料cDNA断片を用いた場合には、mRNAの発現量の相違が、DNAチップ上のスポット間にほとんど認められなかったのに対し、TUP1欠損株から得られた試料cDNA断片を用いた場合には、mRNAの発現量の増減が認められた例が知られている（「実験医学」Vol.17, No.1, 1月号, 1999年）。

【0073】

【実施例】【実施例1】

(1) DNAチップの作製

2重量%アミノプロピルエトキシシラン（信越化学工業（株）製）のエタノール溶液に、スライドガラス（25mm×75mm）を10分間浸した後取り出し、エタノールで洗浄後、110℃で10分間乾燥して、シラン化合物被覆スライドを作成した。次いで、このシラン化合物被覆スライドを、5重量%1,2-ビス（ビニルスルホニルアセトアミド）エタンのリン酸緩衝液（pH8.5）溶液に1時間浸した後取り出し、アセトニトリルで洗浄し、1時間減圧下に乾燥し、ビニルスルホニル基が導入されたスライドを得た。一本鎖のDNA断片

(a)の5'末端にアミノ基が結合した反応性基を有するDNA断片と、一本鎖のDNA断片(b)の5'末端に蛍光標識試薬（FluoroLink Cy5、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）が結合した標識DNA断片とからなる二本鎖DNA断片をPCR法によって得、これを滅菌水に分散してなる水溶液（ $1 \times 10^{-6}M$ ）を上記のスライドに点着した。点着後のスライドの表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、23000であった。そのスライドを、25℃、湿度70%にて一晩放置した後、 $4 \times SSC$ （ $SSC$ ：標準食塩-クエン酸緩衝液）水溶液で5分間洗浄し、さらに0.5Mグリシン水溶液（pH8.5）で1時間洗浄した。次いで、そのスライドを沸騰水に30分間浸漬（変性処理）した後、沸騰水から取り出し、解離しているDNA断片(b)を除去した。そして、スライ

ドを室温で乾燥させてDNAチップF1を得た。DNAチップF1の表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、800であった。

【0074】(2) 試料DNA断片の検出

上記(1)で得たDNAチップF1の表面に、上記

(1)のDNA断片(b)と同じ塩基配列を有するDNA断片の5'末端に蛍光標識試薬（FluoroLink Cy3、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）が結合した標識DNA断片を含むハイブリダイゼーション用溶液（ $4 \times SSC$ 溶液と0.2重量%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）水溶液の混合溶液）50μLを点着した。点着後のDNAチップF1の表面を顕微鏡用カバーガラスで覆い、モイスチャーチャンバ内にて60℃で20時間インキュベートし、室温にて0.1重量%SDS水溶液と $2 \times SSC$ 水溶液との混合溶液で、50℃にて0.1重量%SDS水溶液と $0.2 \times SSC$ 水溶液との混合溶液で、および室温にて $0.2 \times SSC$ の水溶液で順次洗浄した後、600rpmで20秒間遠心し、室温で乾燥した。乾燥後のDNAチップF1の表面の蛍光強度を測定したところ、1000であった。

【0075】沸騰水で処理する時間を長くすることによって、ほぼ完全な二本鎖の解離および解離している一方の鎖のcDNA断片の除去が可能となり、アミノ基を有する他方の鎖のcDNA断片のみを共有結合によってスライドガラスの表面に固定させたDNAチップを作製することができる。また、このようにして作製されたDNAチップは、試料cDNA断片と効率よくハイブリダイズすることが分かる。

【発明の効果】本発明のDNAチップの製造方法によって、ポリヌクレオチドよりも長鎖の一本鎖のDNA断片を基板表面に共有結合によって固定したDNAチップを得ることができる。即ち、本発明の製造方法は、最初に固定した二本鎖のDNA断片をほぼ完全に解離させ、かつ解離している一方のDNA断片をチップの外へ排除することに特徴があり、解離している一方のDNA断片がチップ上に共存し、試料核酸断片と競合反応を起こすことがないため、ハイブリダイゼーションの効率を上げることが可能となる。また、塩基数が約100000の核酸断片が固定されてなる本発明のDNAチップは、遺伝子の発現態様の解析に特に有用である。さらに、本発明のDNAチップは、ハイブリダイゼーション後、沸騰水に供することによって試料核酸断片（または、試料核酸断片および蛍光発生基を有するインターカレータ）を解離または除去することができ、一回乃至数回の範囲で再利用が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のDNAチップの製造方法の工程、本発明のDNAチップおよび本発明の試料核酸断片の検出方法を示す代表的な模式図である。

【図2】試料核酸断片の競合型検出方法を示す模式図で

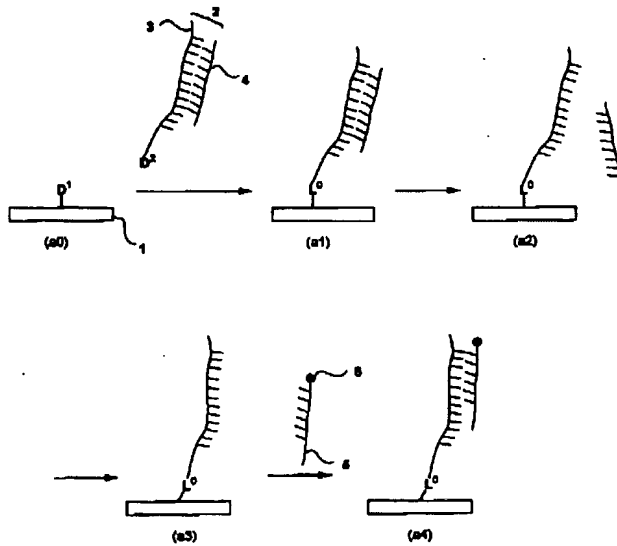
ある。

【符号の説明】

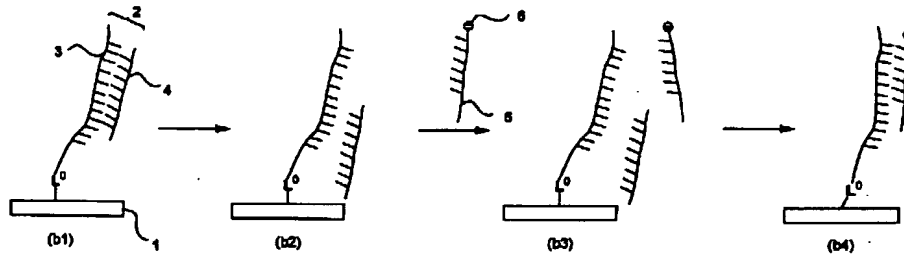
- 1 基板
- 2 二本鎖のDNA断片
- 3 反応性を有する一本鎖のDNA断片

- 4 反応性を有しない一本鎖のDNA断片
- 5 試料核酸断片
- 6 蛍光物質
- a 3 本発明のDNAチップ

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. 7  
G 0 1 N 33/566

識別記号

F I  
C 1 2 N 15/00

テーマコード(参考)  
A

(72)発明者 篠木 浩  
埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ  
イルム株式会社内

(72)発明者 瀬志本 修  
埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ  
イルム株式会社内

(72)発明者 牧野 快彦  
埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ  
イルム株式会社内

F ターム(参考) 2G042 AA01 BD19 FA11  
4B024 AA11 AA20 CA09 HA12 HA14  
4B029 AA07 AA23 BB20 CC01 CC11  
FA03 FA15  
4B063 QA01 QA12 QA17 QA18 QQ42  
QR32 QR55 QR84 QS03 QS34  
QS36 QS39 QX02